

543 437

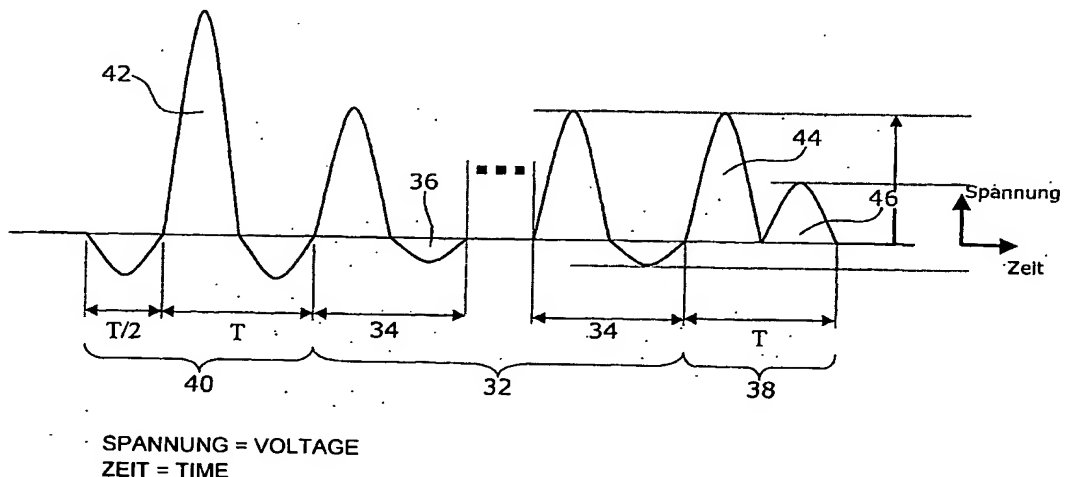
(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. August 2004 (05.08.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/065011 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01L 3/02**, (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVOTEC TECHNOLOGIES GMBH** [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 15a, 40699 Erkrath (DE).
B01J 19/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2004/000565** (72) Erfinder; und
(22) Internationales Anmeldedatum: **23. Januar 2004 (23.01.2004)** (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PRECKEL, Hartwig** [DE/DE]; Reetwerder 17, 21029 Hamburg (DE).
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch** (74) Anwälte: **VON KIRSCHBAUM, Alexander** usw.; De-
ichmannhaus am Dom, Bahnhofsvorplatz 1, 50667 Köln (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch** (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,**
- (30) Angaben zur Priorität: **103 02 464.6** **23. Januar 2003 (23.01.2003)** **DE**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **METHOD FOR FILLING SAMPLE CARRIERS**(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BEFÜLLUNG VON PROBENTRÄGERN**

(57) Abstract: The invention relates to a method for filling sample carriers (26) with a chemical and/or biological liquid. Said method can be carried out by means of a liquid releasing device (10) comprising a liquid chamber (12), a piezoelectric actuator (22) acting on said liquid chamber (12). The production of an exciting pulse by means of the piezoelectric actuator (22) causes liquid drops (24) to be expelled from an outlet (16) towards a sample carrier (26), thus filling recesses (28). In order to avoid wetting (30) in the region of the outlet (16), a pre-pulse (40) is produced before the exciting pulses (34) are produced, and a damping pulse (46) is produced once the filling process is completed.

(57) Zusammenfassung: Ein Verfahren zur Befüllung von Probenträgern (26) mit chemischer und/oder biologischer Flüssigkeit kann mit Hilfe einer Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) erfolgen. Die Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) weist eine Flüssigkeitskammer (12) auf. Auf die Flüssigkeitskammer (12) wirkt ein Piezo-Aktor (22). Durch Erzeugen eines Anregungsimpulses mit Hilfe des Piezo-Aktors (22) werden aus einer Auslaßöffnung (16) Flüssigkeitströpfchen (24) in Richtung eines Probenträgers (26) ausgestoßen. Hierdurch erfolgt ein Befüllen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/065011 A1



CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Befüllung von Probenträgern

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Befüllung von Probenträgern mit chemischen und/oder biologischen Flüssigkeiten.

Beim Dispensieren und Pipettieren von Flüssigkeitsmengen im Bereich weniger Nanoliter bis Mikroliter werden mit Hilfe von Flüssigkeitsabgabevorrichtungen, insbesondere Mikropumpen, Tropfen mit sehr geringem Volumen durch eine Düse ausgestoßen. Die Tropfen werden in der Regel in einem sehr kleinen Zielbereich, z.B. einer Vertiefung (well) in einer Mikrotiterplatte oder einem Bereich eines Objektträgers, gesammelt. Die Dosiermenge wird über die Anzahl der ausgestoßenen Tropfen von sehr kleinem Volumen, i.a. in der Größenordnung von Picolitern, bestimmt. Eine übliche Technik ist die Verwendung von Mikropumpen mit einem Piezo-Aktor. Derartige Flüssigkeitsabgabevorrichtungen weisen eine Pumpenkammer auf, bei der zumindest eine Seitenwand flexibel als Membran ausgebildet ist. Auf die Membran und damit die Flüssigkeit kann durch den Piezo-Aktor ein Druckimpuls ausgeübt werden. Durch die hierdurch erzeugte Druckerhöhung in der Pumpenkammer wird durch eine Austrittsdüse ein Tröpfchen ausgestoßen. Die Pumpenkammer ist üblicherweise mit einem Flüssigkeitsreservoir verbunden. Bei Dispensiervorrichtungen ist in dem Flüssigkeitsreservoir die abzugebende Probenflüssigkeit enthalten. Bei Pipettiervorrichtungen, bei denen die abzugebende Probenflüssigkeit vor der Abgabe durch die Pipettierspitze aufgesaugt und anschließend abgegeben wird, ist in dem Flüssigkeitsreservoir üblicherweise eine Systemflüssigkeit enthalten.

Prinzipbedingt sind diese Pumpen sehr stör anfällig. Für die Verwendung in unbeaufsichtigten automatischen Anlagen, z.B. im Medium- oder Hochdurchsatz-Screening, ist ein zuverlässiger Betrieb der Pumpen jedoch unerlässlich. Störungen müssen daher vermieden werden. Ein häufiges Problem beim Betrieb von Mikropumpen sind Verschmutzungen, wie Ablagerungen oder Benetzungen an der Austrittsdüse durch Komponenten der dispensierten Reagenzien. Ablagerungen oder Benetzungen an der Austrittsöffnung bewirken eine Änderung der Strahlrichtung und damit in der Regel eine Fehlbefüllung des Probenträgers. Sie können durch Reinigung bzw. Abtupfen der Düse behoben werden. Dies ist jedoch äußerst zeitaufwändig. Ferner ist dieser Fehler nur sehr schwer automatisch zu detektieren, insbesondere wenn in einer Anlage auf kleinem Raum sehr viele Pumpen gleichzeitig verwendet werden. Um einen robusten unbeaufsichtigten Betrieb zu erreichen, muss das Auftreten dieses Fehlers daher verhindert werden.

Als Anregungssignal für den Piezo-Aktor wird üblicherweise eine periodische Folge von Rechteck- oder ähnlichen treppen- oder trapezförmigen Impulsen verwendet. Bei jedem Impuls wird ein Tropfen ausgestoßen.

Die in Flüssigkeitsabgabevorrichtungen zum Befüllen von Vertiefungen (wells) eines Probenträgers eingesetzten Mikropumpen werden im Allgemeinen im Dauer- bzw. Burst-Betrieb betrieben. Beim Burst-Betrieb werden über einen längeren Zeitraum kontinuierlich Tropfen abgegeben, indem der Piezo-Aktor periodisch angeregt wird. Ein Burst ist somit eine Gruppe von mehreren Tröpfchen (Tröpfchenserie), die in kurzer zeitlicher Abfolge abgegeben werden, wobei nach einem Burst eine zeitlich längere Pause ist, bevor der nächste Burst durchgeführt wird. Bei einem Burst handelt es sich somit um eine Tröpfchenserie, wobei ein Flüssigkeitsabgabeschritt mehrere Tröpfchenserien aufweisen kann. Innerhalb eines Bursts erfolgt somit kein Ausschwingen der Mikropumpe bzw. der Flüssigkeitsabgabevorrichtung. In der Pause zwischen zwei ggf. mehrere Bursts umfassende Flüssigkeitsabgabeschritten erfolgt beispielsweise ein Positionieren der

- 3 -

Dispensier- oder Pipettiervorrichtung über eine nächste Vertiefung (well) einer Mikrotiterplatte durch Bewegen der Flüssigkeitsabgabevorrichtung und/ oder der Titerplatte. Ein Burst ist beispielsweise 0,1 bis 1 sec. lang. Innerhalb eines Bursts werden, beispielsweise beim Füllen von wells, etwa 20 bis 1000 Tropfen abgegeben. Hierbei wird das abgegebene Gesamtvolumen durch die Anzahl der Tropfen, die der Anzahl der vom Piezo-Aktor auf die Pumpenkammer abgegebenen Impulse entspricht, bestimmt.

Prinzipiell ist auch eine Einzeltropfenabgabe möglich. Hierdurch kann eine äußerst kleine, exakt dosierte Flüssigkeitsmenge abgegeben werden.

Untersuchungen haben ergeben, dass insbesondere im Burst-Betrieb beim Start und vor allem am Ende einer Impulsfolge die Gefahr der Benetzung der Düse besteht. Durch die Benetzung wird die Strahlrichtung beim folgenden Burst verändert. Ein Eintrocknen der Benetzung führt zu Ablagerungen der gelösten Substanzen um die Düsenöffnung herum. Das führt ebenfalls zu einer instabilen Strahlrichtung oder einem Ausfall der Flüssigkeitsabgabevorrichtung.

Die Neigung zur Benetzung der Düsenaußenflächen kann durch eine hydrophobe Beschichtung der Düse verringert werden. Ein bekanntes Verfahren ist die Silanisierung der Glasflächen der Düse. Eine hydrophobe Beschichtung der Düse hat jedoch die Nachteile, dass die Wirkung auf hydrophile Reagenzien beschränkt ist, Probleme mit der Adhäsion von Reagenzien bei geringen Konzentrationen auftreten, die Beschichtung insbesondere bei häufigem Spülen und Abtupfen nicht langzeitstabil ist, eine hydrophobe Beschichtung die Meniskusbildung in der Düsenöffnung stören und damit zu instabilem Betrieb führen kann.

Eine weitere Möglichkeit die Benetzung der Düse zu minimieren ist eine möglichst spitze Form der Düse zu wählen, um die benetzbare Oberfläche klein zu halten. Eine sehr spitze Form der Düse, um die benetzbare Oberfläche

- 4 -

zu minimieren, hat jedoch die Nachteile, dass die mechanische Stabilität verringert ist, die Herstellung schwieriger und teuer ist und es technisch nicht möglich ist, die benetzbare Oberfläche so klein zu machen, dass gar keine Flüssigkeit mehr haften bleibt.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Befüllung von Probenträgern zu schaffen, bei dem die Gefahr der Bildung von Ablagerungen oder Benetzungen an der Austrittsdüse einer Flüssigkeitsabgabevorrichtung verringert ist.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt erfindungsgemäß durch die Merkmale des Anspruchs 1 bzw. 3.

Es wurde herausgefunden, dass die Neigung zur Benetzung der Düse beim Start der Anregungsimpulsfolge auf der Tatsache beruht, dass z.B. der Dispenser noch nicht eingeschwungen ist, und der Tropfen dadurch mit geringerem Impuls abgeschossen wird. Ferner wurde herausgefunden, dass die Neigung zur Benetzung der Düse beim Beenden der Anregungsimpulsfolge auf ein Nachschwingen des Dispensers zurückzuführen ist. Dabei wird Flüssigkeit aus der Düse gedrückt, die aber nicht mehr als Tropfen abgegeben wird. Diese Flüssigkeit wird entweder in die Düse zurückgezogen oder benetzt durch Adhäsionskräfte die Düsenaußenfläche.

Bei einer ersten erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens zur Befüllung von Vertiefungen eines Probenträgers wird die durch das Nachschwingen hervorgerufene Benetzung bzw. Ablagerung verringert bzw. vollständig beseitigt. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird in einem Positionierschritt die Flüssigkeitsabgabevorrichtung, d. h. der Dispenser, über einer ersten Vertiefung (well) positioniert, wobei das Positionieren durch Bewegen der Flüssigkeitsabgabevorrichtung und/ oder des Probenträgers erfolgt. Die Flüssigkeitsabgabevorrichtung weist eine Flüssigkeitskammer auf, wobei auf die Flüssigkeitskammer durch einen Impulsgeber eingewirkt und

- 5 -

durch einen Anregungsimpuls Tröpfchen erzeugt werden. Die Tröpfchen werden vorzugsweise durch einen in dem Dispenser vorgesehenen Kapillarkanal in Richtung der Vertiefung abgegeben. Nach dem Positionierschritt erfolgt ein Flüssigkeitsabgabeschritt indem durch Aktivieren des Impulsgebers mehrere Tröpfchen in die erste Vertiefung abgegeben werden. Hierbei umfasst ein Flüssigkeitsabgabeschritt mindestens eine Tröpfchenserie, in der mehrere Tröpfchen abgegeben werden. Anschließend erfolgt ein Wiederholen des Positionierschrittes in dem die Flüssigkeitsabgabevorrichtung über einer weiteren Vertiefung positioniert wird und in dem sich daran anschließendem Flüssigkeitsabgabeschritt diese Vertiefung durch Abgabe mehrerer Tröpfchen in einer oder mehreren Tröpfchenserien gefüllt wird. Der Positionierschritt und der sich hieran anschließende Flüssigkeitsabgabeschritt wird mehrfach zur Befüllung sämtlicher gewünschter Vertiefungen wiederholt. Zur Vermeidung von Benetzungen und Ablagerungen durch das Nachschwingen der Flüssigkeitsabgabevorrichtung, wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren am Ende der Tröpfchenserie von dem Impulsgeber ein Dämpfungsimpuls erzeugt. Erfindungsgemäß werden somit einerseits durch Anregungsimpulse eine Vielzahl von Tröpfchen (Burst) erzeugt, wobei die Flüssigkeitsabgabevorrichtung in Schwingungen versetzt wird. Diese Schwingungen werden am Ende des Bursts bzw. der Tröpfchenserie durch mindestens einen Dämpfungsimpuls erfindungsgemäß gedämpft. Hierbei erfolgt der Dämpfungsimpuls, beispielsweise am Ende eines Tröpfchenabgabezykluses, insbesondere im Bereich der letzten Tröpfchenabgabe und besonders bevorzugt unmittelbar nach der letzten Tröpfchenabgabe. Durch die Wahl des Zeitpunktes, zu dem der Dämpfungsimpuls erzeugt wird, kann die Schwingung der Flüssigkeitsabgabevorrichtung erheblich gedämpft werden. Dies hat zumindest ein Verringern oder sogar vollständiges Vermeiden der Gefahr von Benetzungen zur Folge.

Bei einer zweiten bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt ein Verringern der Gefahr von Ablagerungen bzw.

Benetzungen beim Start einer Anregungsimpulsfolge. Hierzu wird erfindungsgemäß zu Beginn der Tröpfchenserie ein Vorimpuls erzeugt, der zeitlich den Anregungsimpulsen vorgelagert ist. Erfindungsgemäß ist die Amplitude des Vorimpulses größer als diejenige des Anregungsimpulses. Dadurch wird der erste Tropfen schon mit einem hohen Impuls abgeschossen und dadurch die Gefahr der Benetzung der Düse verringert. Bei einem relativ schwachen ersten Impuls, der z.B. den übrigen Anregungsimpulsen entspricht, kann eine Benetzung der Düse erfolgen, da ein Teil des ersten Tropfens an der Düse hängen bleiben kann. Dies ist durch einen erhöhten ersten Impuls ausgeschlossen. Ein dauerhafter Betrieb mit einer hohen Amplitude würde dagegen zum Ausfall des Dispensers führen, da durch die große Amplitude beim Zurückschwingen der Flüssigkeitssäule Luft durch die Düse in die Dispenserkammer gezogen würde.

Das Vorsehen eines Vorimpulses mit höherer Amplitude hat ferner den Vorteil, dass auch das Volumen des ersten Tropfens im Wesentlichen die selbe Größe hat wie die Volumina der von späteren Anregungsimpulsen erzeugten Tropfen. Bei konstanter Amplitude wäre das Volumen des ersten Tropfens geringer, da das System noch nicht eingeschwungen ist.

Besonders bevorzugt ist es, die beiden vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zu kombinieren, so dass sowohl ein Vorimpuls als auch ein Dämpfungsimpuls vorgesehen ist. Durch das Vorsehen des Dämpfungsimpulses kann ein Auftreten von Ablagerungen oder Benetzungen an der Austrittsdüse verringert oder sogar vollständig vermieden werden. Hierdurch ist ein Ausfall der Flüssigkeitsabgabevorrichtung oder ein erforderliches Reinigen nicht oder nur erheblich seltener der Fall. Insbesondere ist die Strahlrichtung, d.h. die Abgaberrichtung der Flüssigkeitströpfchen, durch Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht mehr beeinträchtigt, so dass insbesondere beim Befüllen von Vertiefungen einer Mikrotiterplatte o.dgl., die sehr kleine Querschnittsöffnungen aufweisen, sichergestellt, dass die abgegebene Flüssigkeit auch in die entsprechende Vertiefung gelangt. Diese

- 7 -

Vorteile werden durch die Kombination der beiden erfindungsgemäßen Verfahren, d.h. durch Vorsehen eines Vorpulses und eines Dämpfungsimpulses, noch verbessert.

Ferner sind sehr kurze Burstlängen bzw. Betriebszyklen mit ggf. kurzen Pausenzeiten möglich. Insbesondere auf Grund des erfindungsgemäßen Vorsehens eines Dämpfungsimpulses ist die Nachschwingzeit des Systems erheblich verringert. Hierdurch ist es möglich, die Pausenzeiten zwischen zwei Betriebszyklen bzw. Bursts erheblich zu verringern. Derartige Betriebszustände sind ohne das Vorsehen eines Dämpfungsimpulses und/oder eines Vorimpulses instabil. Dadurch können z.B. Reagenzien in eine wenige Mikroliter große Vertiefung mit sedimentierten Zellen gegeben werden, ohne die gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Boden der Vertiefung zu verändern. Das ist für das Auslesen bzw. Untersuchen von Assays mit Suspensionszellen wichtig.

Vorzugsweise wird der Dämpfungs- und/oder der Vorimpuls von dem Impulsgeber der Flüssigkeitsabgabevorrichtung erzeugt, der auch die Anregungsimpulse zur Tröpfchenabgabe erzeugt.

Besonders bevorzugt ist es bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, das System, d.h. im Wesentlichen die Flüssigkeitsabgabevorrichtung, in Resonanzfrequenz zu betreiben. Insbesondere innerhalb eines Bursts werden die Anregungsimpulse vorzugsweise in einem zeitlichen Abstand abgegeben, der auf die Resonanzfrequenz des Systems abgestimmt ist. Der neue Anregungsimpuls ist somit mit dem ersten Nachschwingen des Systems synchronisiert. Die Eigenschwingung des Systems wird somit ausgenutzt. Das Betreiben in Resonanzfrequenz hat ferner den Vorteil, dass auch innerhalb eines Bursts das Benetzen der Düse durch Probenflüssigkeit vermieden ist, da eine Benetzung frühestens beim ersten Nachschwingen auftreten könnte und dieses Nachschwingen erfindungsgemäß bereits zum Ausstoßen des nächsten Tröpfchens genutzt wird. Beim Betreiben des Systems in Resonanzfrequenz

werden die Anregungsimpulse somit in Abhängigkeit der Resonanzfrequenz des Systems in einem konstanten zeitlichen Abstand t erzeugt. Vorzugsweise wird der erfindungsgemäße Nachimpuls bei einem in Resonanzfrequenz betriebenen System im zeitlichen Abstand von $t/2$ zum letzten Anregungsimpuls erzeugt. Die Durchführung des Verfahrens bei der Resonanzfrequenz ermöglicht eine besonders schnelle Abgabe der Tropfen und damit die Anwendung im Hochdurchsatz-Screening.

Der Dämpfungsimpuls wird vorzugsweise im Wesentlichen nach der Abgabe des letzten Tröpfchens erzeugt. Besonders bevorzugt ist es, dass der Dämpfungsimpuls unmittelbar anschließend an den letzten Impuls der Tröpfchenabgabe, insbesondere innerhalb des nächsten Schwingungszyklus, erzeugt wird. Hierbei ist der Dämpfungsimpuls vorzugsweise entgegengesetzt der Nachschwing-Richtung der Flüssigkeitsabgabevorrichtung ausgerichtet. Bei einer beispielsweise sinusförmigen Anregung durch den Piezo-Aktor in der Resonanzfrequenz der Flüssigkeitsabgabevorrichtung und damit einem sinusförmigen Schwingen der Flüssigkeitsabgabevorrichtung bzw. des Systems ist der Dämpfungsimpuls somit vorzugsweise gegenphasig zur momentanen Schwingungsphase der Anregung bzw. wirkt der Schwingung der Vorrichtung entgegen.

Die Amplitude des Dämpfungsimpulses beträgt vorzugsweise mindestens 20 % und besonders bevorzugt mindestens 30 % der Amplitude der Anregungsimpulse. Besonders gute Ergebnisse konnten mit Amplituden im Bereich von 50 % der Amplitude des Anregungsimpulses erzielt werden.

Besonders bevorzugt ist es, die Länge des Dämpfungsimpulses in Abhängigkeit der Länge des Anregungsimpulses zu variieren, wobei eine Verbesserung der Ergebnisse durch eine Verlängerung der Dauer des Dämpfungsimpulses gegenüber dem Anregungsimpuls um vorzugsweise 3 bis 15 %, besonders bevorzugt 5 bis 10 %, erzielt werden kann.

- 9 -

Die Amplitude des Vorimpulses ist vorzugsweise mindestens 20 % und besonders bevorzugt mindestens 50 % größer als die Amplitude des Anregungsimpulses. Die Wahl der Größe der Amplitude des Vorimpulses ist u.a. von der Viskosität der Flüssigkeit abhängig. Bei unterschiedlichen Flüssigkeiten konnten gute Ergebnisse mit der Erhöhung des Vorimpulses um 50 bis 100 % erzielt werden.

Insbesondere beim Medium- oder Hochdurchsatz-Screening werden zur Befüllung der einzelnen Vertiefungen in einem Anregungszyklus bzw. Burst mindestens 5, vorzugsweise mindestens 10 und besonders bevorzugt mindestens 20 Tröpfchen abgegeben.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand bevorzugter Ausführungsformen unter Bezugnahme auf die anliegenden Zeichnungen näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Vorderansicht einer Flüssigkeitsabgabevorrichtung,

Fig. 2 eine schematische Schnittansicht entlang der Linie II-II in Fig. 1,

Fig. 3 eine schematische Vergrößerung einer Auslassöffnung der Flüssigkeitsabgabevorrichtung,

Fig. 4 eine schematische Darstellung eines Anregungs-Impulsverlaufs und

Fig. 5 ein konkretes Beispiel des Anregungs-Impulsverlaufs über die Zeit.

Eine Flüssigkeitsabgabevorrichtung 10 (Fig. 1 und 2) weist eine Flüssigkeitskammer 12 auf. Die Flüssigkeitskammer ist über einen Kanal 14 mit einem nicht dargestellten Vorratsbehälter verbunden. Die Flüssigkeitskammer weist einen in Richtung einer Austrittsöffnung 16

verlaufenden Austrittskanal 18 auf. Der Austrittskanal 18 ist vorzugsweise als Kapillarkanal ausgebildet.

Eine Rückwand 20 (Fig. 2) der Flüssigkeitskammer 12 ist flexibel, insbesondere als Membran, ausgebildet. Außerhalb der Flüssigkeitskammer 12 ist benachbart zu der Rückwand 20 ein Piezo-Aktor 22 angeordnet, der mit einer elektrischen Steuereinrichtung verbunden ist. Durch eine entsprechende Ansteuerung des Piezo-Aktors 22 werden kurze Impulse auf die Flüssigkeitskammer 12 übertragen. Hierdurch werden Tröpfchen 24 durch die Austrittsöffnung 16 ausgestoßen. Der Piezo-Aktor 22 dient somit als Impulsgeber, durch den in sehr kurzen zeitlichen Abständen Impulse auf die Flüssigkeitskammer 12 übertragen werden können.

Die Tröpfchen 24 werden in Richtung eines Probenträgers 26 abgegeben und dienen zur Befüllung von Vertiefungen bzw. wells 28 in dem Probenträger 26.

Derartige Flüssigkeitsabgabevorrichtungen, wie der in den Fign. 1 und 2 dargestellte Dispenser oder eine entsprechende Pipettiervorrichtung, werden erfindungsgemäß vorzugsweise im Bereich der Resonanzfrequenz betrieben. Hierbei wird die Flüssigkeitsabgabevorrichtung 10 auf Grund des mit hoher Frequenz betriebenen Piezo-Aktors 22 in Schwingungen versetzt. Nach Beenden eines Tröpfchenabgabezykluses bzw. eines Anregungszykluses erfolgt ein Nachschwingen der Flüssigkeitsabgabevorrichtung 10. Durch dieses Nachschwingen treten geringe Flüssigkeitsmengen aus der Austrittsöffnung 16 (Fig. 3) aus. Hierdurch können Benetzungen oder Ablagerungen 30 im Bereich der Austrittsöffnung 16 entstehen. Entsprechende Ablagerungen oder Benetzungen 30 können auch dadurch entstehen, dass zu Beginn eines Anregungszykluses die Flüssigkeitsabgabevorrichtung die Tröpfchen 24 noch nicht mit genügend hoher Geschwindigkeit ausgestoßen werden, da die Flüssigkeitsabgabevorrichtung noch nicht eingeschwungen ist.

Um das Auftreten derartiger Ablagerungen oder Benetzungen 30 zu vermeiden oder das Risiko derartiger Ablagerungen zumindest zu verringern, werden die Impulse, mit denen der Piezo-Aktor 22 angesteuert wird, erfindungsgemäß, beispielsweise wie anhand der Fign. 4 und 5 dargestellt, erzeugt.

Innerhalb eines erfindungsgemäßen Anregungszykluses 32, d.h. innerhalb eines Burstvorgangs bzw. Flüssigkeitsabgabeschritts, in dem mehrere Tröpfchen 24 zur Befüllung der Vertiefungen 28 kontinuierlich abgegeben werden, erfolgt eine kontinuierliche Erzeugung von Anregungsimpulsen 34 (Fig. 5). Hierbei besteht jeder Anregungsimpuls 34 beispielsweise aus einer sinusförmigen Welle der Amplitude A. Die negative Halbwelle 36 einer sinusförmigen Welle weist eine erheblich geringere Amplitude, beispielsweise 10 % der Amplitude A, auf. Die Frequenz $\frac{1}{T}$ entspricht der Resonanzfrequenz der Flüssigkeitsabgabevorrichtung 10. Die Flüssigkeitsabgabepumpe 10, wie sie im Medium- oder Hochdurchsatz-Screening eingesetzt wird, wird mit einer Frequenz von 3.000 bis 4.000 Hz betrieben.

Die Amplitude A beträgt 40 Volt. Das Sinussignal wird verwendet, um im System nur die Hauptmode anzuregen und Störungen durch höhere Moden zu vermeiden. Die Resonanzfrequenz wird verwendet, um mit einem kleinen Anregungssignal eine große Amplitude zu erreichen. Ferner ist dies nötig, damit auch in den Transienten eine bekannte Phasenbeziehung zwischen Anregungssignal und Membranschwingung besteht. Dadurch kann ein Dämpfungsimpuls 46 am Ende des Flüssigkeitsabgabeschrittes auf einfache Weise gegenphasig zum Anregungspuls 34 bzw. zur zweiten Halbwelle 36 erfolgen ohne die Membranschwingung messen oder berechnen zu müssen. Vorzugsweise wird eine asymmetrische Amplitude eingesetzt, um einerseits den Arbeitsbereich des Piezoelements und der Silizium-Membran gut auszunutzen, andererseits das Piezoelement nicht durch zu große negative Spannungen zu zerstören.

Ein Vorpuls, der zu Beginn des Flüssigkeitsabgabeschrittes erfolgt, ist ein normaler Anregungsimpuls mit einer um den Faktor 2 größeren Amplitude. Das Signal beginnt im dargestellten Ausführungsbeispiel mit der negativen Halbwelle, um eine größere Austrittsgeschwindigkeit des ersten Tropfens zu erreichen.

Vor dem Dämpfungsimpuls 46 ist eine erste Halbwelle 44 eines Anregungsimpulses vorgesehen. Die zweite Halbwelle (negative Halbwelle) ist durch eine positive Halbwelle, den Dämpfungsimpuls 46, mit einer 50 % kleineren Amplitude als die erste Halbwelle 44 ersetzt. Die zweite, positive Halbwelle dient somit als Dämpfungsimpuls 46. Da das System in Resonanz betrieben wird und sich im eingeschwungenen Zustand befindet, bewirkt dieser Dämpfungsimpuls 46 eine starke Dämpfung des Nachschwingens.

Insbesondere die Form des Vorimpulses 40 kann variiert werden, wobei ein rechteckförmiger Vorimpuls vorteilhaft ist. Ebenso ist die Amplitude sowie die Länge des Vorimpulses 40 variierbar. Dies gilt auch für die Form des Dämpfungsimpulses 46 sowie für dessen Amplitudengröße und -länge.

Anstelle der Abgabe einer Vielzahl von Tröpfchen mit kleinem Volumen in ein well einer Mikrotiterplatte ist es auch möglich, das Volumen beispielsweise auf einen ebenen Objektträger abzugeben. Auf Grund des geringen Volumens bildet sich auf dem Objektträger ein auf diesem haftender Tropfen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Befüllen von Vertiefungen (28) eines Probenträgers (26) mit chemischen und / oder biologischen Flüssigkeiten, bei welchem

ein Positionierschritt zur Positionierung einer Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) über einer ersten Vertiefung (28) durchgeführt wird, wobei die Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) eine Flüssigkeitskammer (12) aufweist, auf die zum Erzeugen der Tröpfchen (24) ein durch einen Impulsgeber (22) erzeugter Anregungsimpuls (34) einwirkt,

in einem Flüssigkeitsabgabeschritt mindestens eine Tröpfchenserie durchgeführt wird, wobei in einer Tröpfchenserie mehrere Tröpfchen (24) in die erste Vertiefung (28) abgegeben werden und

der Positionierschritt zur Positionierung der Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) über weiteren Vertiefungen (28) sowie der Flüssigkeitsabgabeschritt zur Abgabe mehrere Tröpfchen (24) in mindestens einer Tröpfchenserie in diese Vertiefung (28) mehrfach wiederholt wird

g e k e n n z e i c h n e t d u r c h

einen am Ende der Tröpfchenserie von dem Impulsgeber (22) erzeugten Dämpfungsimpuls (38,46) zur Dämpfung des Nachschwingens der Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10).

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem zu Beginn des Flüssigkeitsabgabeschrittes ein Vorimpuls (40) mit größerer Amplitude als der Anregungsimpuls (34) vor dem ersten Anregungsimpuls (34) vom Impulsgeber (22) erzeugt wird.

- 14 -

3. Verfahren zum Befüllen von Vertiefungen (28) eines Probenträgers (26) mit chemischen und / oder biologischen Flüssigkeiten, bei welchem

ein Positionierschritt zur Positionierung einer Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) über einer ersten Vertiefung (28) durchgeführt wird, wobei die Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) eine Flüssigkeitskammer (12) aufweist, auf die zum Erzeugen der Tröpfchen (24) ein durch einen Impulsgeber (22) erzeugter Anregungsimpuls (34) einwirkt,

in einem Flüssigkeitsabgabeschritt mindestens eine Tröpfchenserie durchgeführt wird, wobei in einer Tröpfchenserie mehrere Tröpfchen (24) in die erste Vertiefung (28) abgegeben werden und

der Positionierschritt zur Positionierung der Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) über weiteren Vertiefungen (28) sowie der Flüssigkeitsabgabeschritt zur Abgabe mehrere Tröpfchen (24) in mindestens einer Tröpfchenserie in diese Vertiefung (28) mehrfach wiederholt wird

gekennzeichnet durch

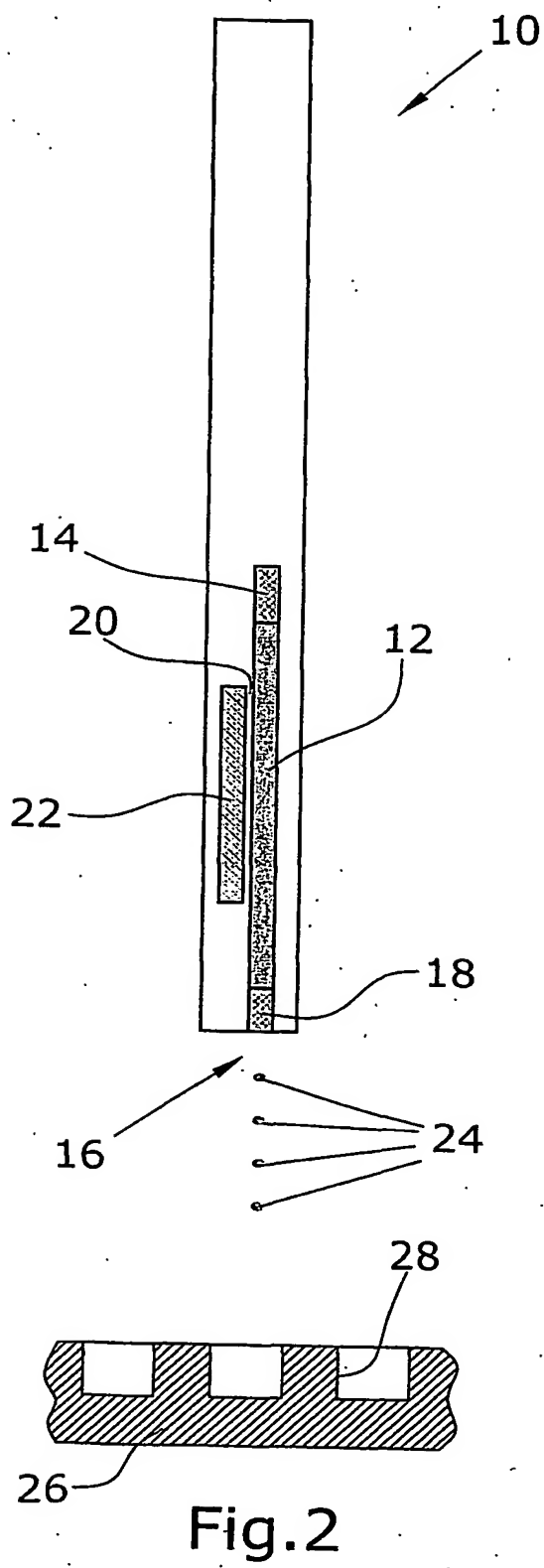
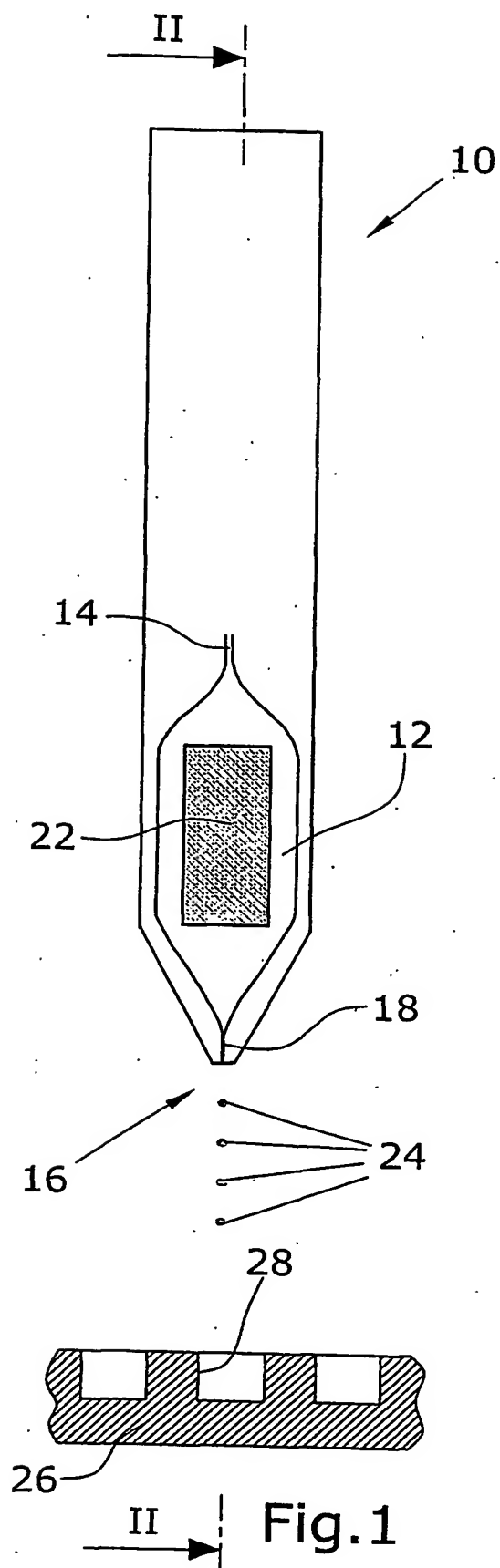
einen zu Beginn der Tröpfchenserie vom Impulsgeber (22) erzeugten Vorimpuls (40), der vor dem ersten Anregungsimpuls abgegeben wird, wobei die Amplitude des Vorimpulses (40) größer ist als die des Anregungsimpulses (34).

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei welchem am Ende des Flüssigkeitsabgabeschrittes vom Impulsgeber (22) ein Dämpfungsimpuls (38,46) zur Dämpfung des Nachschwingens der Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) erzeugt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 4, bei welchem bei Betrieb in Resonanzfrequenz der Dämpfungsimpuls (46) durch die Phasenumkehr des Anregungsimpulses erzeugt wird;
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4 oder 5, bei welchem der Dämpfungsimpuls (46) im Wesentlichen nach der Abgabe des letzten zur Befüllung abgegebenen Tröpfchens (24) erzeugt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4, 5 oder 6, bei welchem der Dämpfungsimpuls (46) im Wesentlichen der momentanen Schwingung der Flüssigkeitsabgabevorrichtung entgegen wirkt.
8. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 4-7, bei welchem die Amplitude des Dämpfungsimpulses (46) mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 % der Amplitude des Anregungsimpulses (44) beträgt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 4-8, bei welchem die Dauer des Dämpfungsimpulses länger, vorzugsweise 3 bis 15 % und besonders bevorzugt 5 bis 10 % länger als die Dauer des Anregungsimpulses (44) ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-9, bei welchem die Amplitude des Vorimpulses (40) mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 50 % und besonders bevorzugt 50 bis 100 % größer als die Amplitude (A) des Anregungsimpulses (38) ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-10, bei welchem durch den Vorimpuls (40) das erste Tröpfchen abgegeben wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, bei welchem zur Befüllung der Vertiefung (28) mindestens 5, vorzugsweise mindestens 10 und besonders bevorzugt mindestens 20 Tröpfchen abgegeben werden.

- 16 -

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, bei welchem die Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) bei Resonanzfrequenz betrieben wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, bei welchem die Flüssigkeitsabgabe durch eine in der Flüssigkeitsabgabevorrichtung (10) vorgesehene, mit der Flüssigkeitskammer (12) verbundene Kapillarkammer (18) erfolgt.



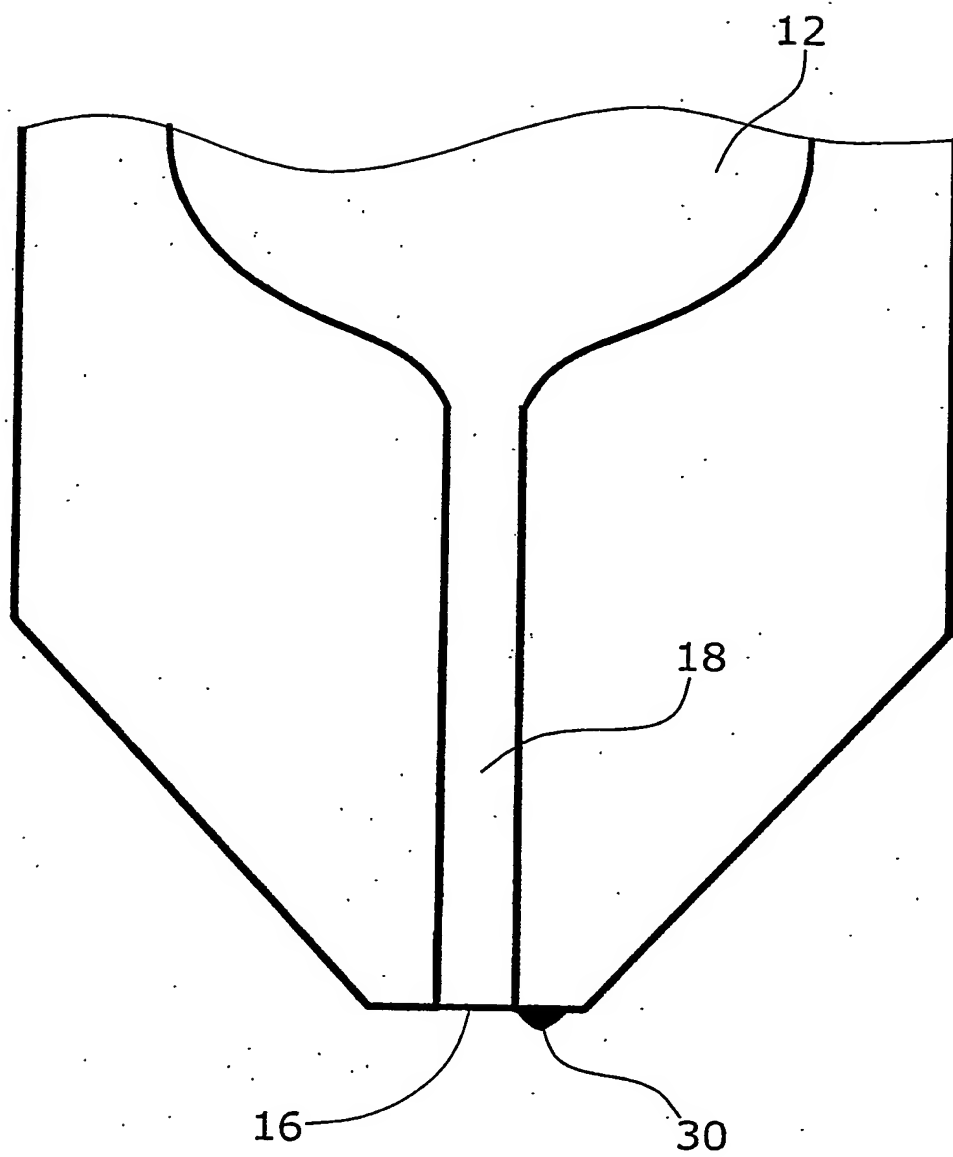


Fig.3

Fig.4

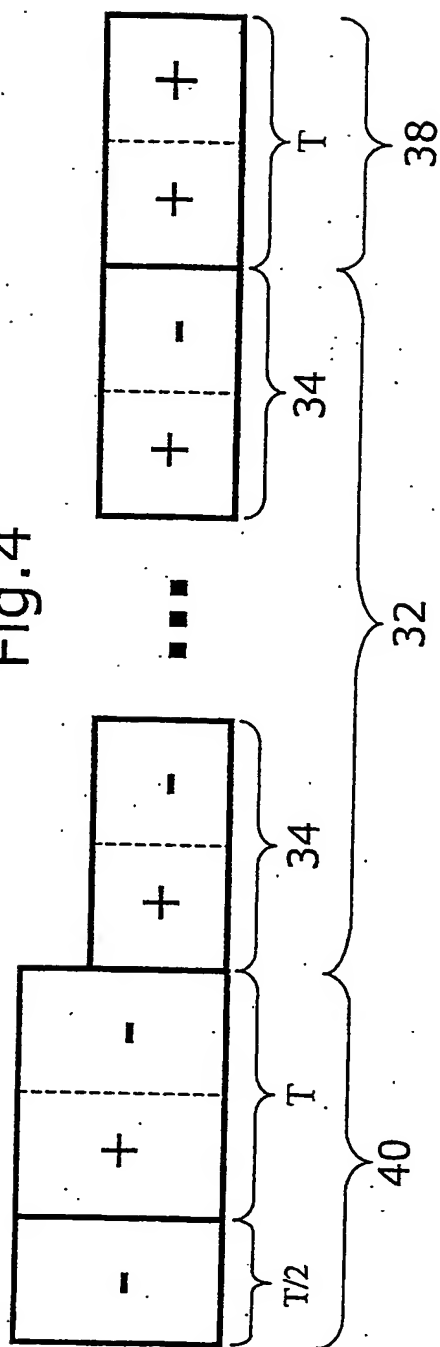
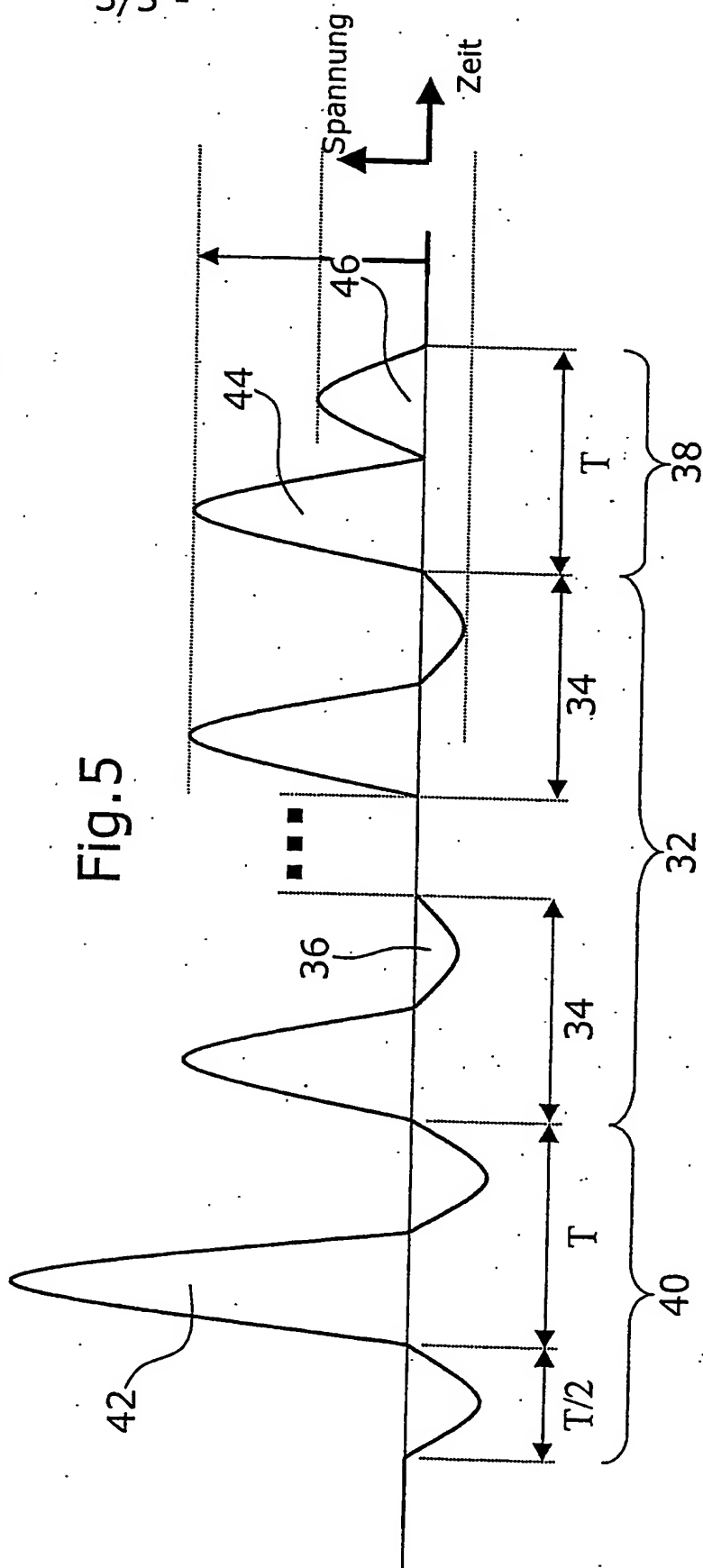


Fig.5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/000565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01L3/02 B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B01L B01J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | US 6 296 811 B1 (SASAKI GLENN C) 2 October 2001 (2001-10-02) column 3, line 12 - column 4, line 16 | 1 |
| A | US 6 367 925 B1 (CHEN TING ET AL) 9 April 2002 (2002-04-09) column 3, line 12 - line 37 | 1 |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 2004

Date of mailing of the international search report

03/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tragoustis, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/000565

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|------------|
| US 6296811 | B1 | 02-10-2001 | AT 244604 T | 15-07-2003 |
| | | | AU 3118900 A | 26-06-2000 |
| | | | CA 2354555 A1 | 15-06-2000 |
| | | | DE 69909511 D1 | 14-08-2003 |
| | | | DE 69909511 T2 | 15-04-2004 |
| | | | DK 1137489 T3 | 20-10-2003 |
| | | | EP 1316361 A2 | 04-06-2003 |
| | | | EP 1137489 A1 | 04-10-2001 |
| | | | ES 2201823 T3 | 16-03-2004 |
| | | | JP 2002531259 T | 24-09-2002 |
| | | | PT 1137489 T | 31-10-2003 |
| | | | WO 0033961 A1 | 15-06-2000 |
| | | | US 2001055814 A1 | 27-12-2001 |
| | | | US 6367925 | B1 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000565

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B01L3/02 B01J19/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 B01L B01J G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | US 6 296 811 B1 (SASAKI GLENN C) 2. Oktober 2001 (2001-10-02) Spalte 3, Zeile 12 - Spalte 4, Zeile 16 | 1 |
| A | US 6 367 925 B1 (CHEN TING ET AL) 9. April 2002 (2002-04-09) Spalte 3, Zeile 12 - Zeile 37 | 1 |

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Mai 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/06/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tragoustis, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/000565

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 6296811 | B1 | 02-10-2001 | AT 244604 T 15-07-2003 |
| | | | AU 3118900 A 26-06-2000 |
| | | | CA 2354555 A1 15-06-2000 |
| | | | DE 69909511 D1 14-08-2003 |
| | | | DE 69909511 T2 15-04-2004 |
| | | | DK 1137489 T3 20-10-2003 |
| | | | EP 1316361 A2 04-06-2003 |
| | | | EP 1137489 A1 04-10-2001 |
| | | | ES 2201823 T3 16-03-2004 |
| | | | JP 2002531259 T 24-09-2002 |
| | | | PT 1137489 T 31-10-2003 |
| | | | WO 0033961 A1 15-06-2000 |
| | | | US 2001055814 A1 27-12-2001 |
| US 6367925 | B1 | 09-04-2002 | KEINE |